

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.007

蟾蜍毒素联合紫杉醇抑制人胃癌 MGC803 细胞增殖和诱导凋亡的作用

朱志图,王 镨,李恩泽,刘阳阳,哈敏文

Bufalin and Paclitaxel Inhibited Proliferation and Induced Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line MGC803

ZHU Zhi-tu, WANG Kai, LI En-ze, LIU Yang-yang, HA Min-wen

Department of Medical Oncology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Corresponding Author: WANG Kai, E-mail: scdf5@yahoo.com.cn.

Abstract: Objective To investigate the effects of bufalin and Paclitaxel on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line MGC803. **Methods** MGC803 treated by various concentrations of bufalin and Paclitaxel alone or in combination. The inhibition rate of cell growth detected by MTT assay, the apoptosis by flow cytometry and the protein expression of cell apoptosis associated proteins C-FLIP_L and Caspase-8 by Western blot. **Results** Bufalin or Paclitaxel effectively inhibited the growth of MGC803 gastric cancer cells in a concentration-dependent manner at certain range of concentrations. The inhibitory rate of bufalin combined with Paclitaxel was significantly higher than that of single drug group ($P < 0.05$). The values of combination index (CI) at 24 h, 48 h and 72 h were 0.77, 0.86 and 0.72 respectively. The apoptosis rate at 24 h induced by 25 ng/ml Paclitaxel and 40 nmol/L bufalin was 19.74% and 14.13% respectively, and lower than that induced by combined treatment (53.30%, $P < 0.05$). According to control group as a baseline, C-FLIP_L protein expression of Paclitaxel group, bufalin group and combined group were 78.38%, 63.71% and 46.73% on the contrary, Caspase-8 protein expression were 150.25%, 156.86% and 180.58% respectively. **Conclusion** Paclitaxel and bufalin had a synergistic effect on growth inhibition and apoptosis gastric cancer MGC803 cells and enhanced Caspase-8 expression and decreased C-FLIP expression.

Key words: Gastric cancer; Apoptosis; Paclitaxel; Bufalin; C-FLIP; Caspase-8

摘要:目的 探讨蟾蜍毒素联合紫杉醇抑制人胃癌 MGC803 细胞增殖及诱导凋亡的作用。**方法** 应用 MTT 法检测不同浓度蟾蜍毒素及紫杉醇单药及联合对胃癌细胞 MGC803 增殖抑制作用;流式细胞术分析细胞凋亡和周期阻滞;Western blot 法检测 C-FLIP_L、Caspase-8 蛋白的表达。**结果** (1)蟾蜍毒素及紫杉醇单药均抑制 MGC803 细胞增殖,呈剂量-时间依赖效应,且联合用药的细胞增殖抑制率明显高于单药组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。24、48 及 72 h 联合指数(CI)分别为 0.77、0.86、0.72;(2)40 nmol/L 蟾蜍毒素、25 ng/ml 紫杉醇单药及联合作用细胞 24 h,流式细胞仪检测凋亡率分别为 14.13%、19.74%及 53.30%,联合组与单药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);(3)Western blot 结果显示,蟾蜍毒素、紫杉醇单药组及联合组作用细胞 24 h 后,C-FLIP_L 蛋白表达依次下降至对照组的 78.38%、64.71%、46.73%,Caspase-8 蛋白表达上调至对照组的 150.25%、156.86%、180.58%。**结论** 蟾蜍毒素协同紫杉醇诱导胃癌 MGC803 细胞凋亡,且可能与下调 C-FLIP、上调 Caspase-8 蛋白有关。

关键词: 胃癌;凋亡;紫杉醇;蟾蜍毒素;C-FLIP;Caspase-8

中图分类号:R73-36;R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)11-1245-04

收稿日期:2010-12-06;修回日期:2011-06-15

基金项目:辽宁省科技厅 2009 年博士科研启动资助基金项目(20091051)

作者单位:121001 辽宁锦州,辽宁医学院附属第一医院肿瘤科

通信作者:王镨, E-mail: scdf5@yahoo.com.cn

作者简介:朱志图(1971-),男,博士,副教授,主要从事肿瘤凋亡与生物治疗的研究

0 引言

胃癌是全球第四高发、第二高死亡率的恶性肿瘤,我国的胃癌患者发病数占全世界发病总数的 42%^[1],早期胃癌诊断困难,有三分之二的患者就诊时已是晚期,单纯手术治疗疗效有限,需行以化疗为

主的综合治疗。蟾蜍毒素(bufoalin)是我国传统中药,有强心、麻醉等作用,近年来研究发现其有抗肿瘤的作用^[2]。胃癌的治疗总体预后较差,5年生存率为20%~30%,单药紫杉类药物一线和二线治疗有效率在15%~24%,疗效不甚理想,本研究采用蟾蜍毒素联合紫杉醇作用人胃癌MGC803细胞,观察两药联合在体外对胃癌细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用,并探讨其可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞、药物和试剂

人胃癌MGC803细胞由中国医科大学肿瘤实验室惠赠;紫杉醇购于哈药集团生物工程有限公司;蟾蜍毒素购于Sigma公司,用无水乙醇配成0.01 mol/L贮存液, -20℃冻存,实验时用PBS稀释成所需浓度,乙醇终浓度<0.01%,预实验表明,该浓度乙醇对细胞增殖无影响;RPMI1640培养液购于Gibco公司;胎牛血清购于中国医学科学院血液学研究所;PI、MTT购于Sigma公司;C-FLIP_L抗体购于SANTA CRUZ公司;Caspase-8单抗购于北京博奥森公司。

1.2 MTT法检测蟾蜍毒素和紫杉醇单药及联合用药对胃癌细胞增殖抑制

取处对数生长期的MGC803细胞,常规消化制成单细胞悬液,计数并调整密度为(3~5)×10⁴个/毫升,每孔180 μl,接种于96孔板中,次日加入不同浓度的紫杉醇、蟾蜍毒素及联合药物,对照组加入培养液,继续培养24、48、72 h,终止培养前4 h加入20 μl MTT,到预定时间每孔加200 μl DMSO,微量振荡器震荡10 min,酶联免疫检测仪于570 nm波长测定各孔吸光度值,按细胞增殖抑制率计算公式计算细胞增殖抑制率,计算药物抑制细胞增殖50%的浓度(IC₅₀)及联合指数。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组平均OD值/对照组平均OD值)×100%,每组重复3次。

1.3 流式细胞仪检测蟾蜍毒素和紫杉醇单药及联合用药后胃癌细胞的周期阻滞及凋亡率

收集对照组及处理组细胞,离心频率1 000 r/min离心5 min,冷PBS洗涤2次,加入70%的冷乙醇4℃过夜固定,1 000 r/min再离心5 min,后加入终浓度为10 mg/ml的PI,避光反应30 min后进行流式细胞仪测定,采用Cell Quest进行细胞各期的百分比分析,判定凋亡细胞百分率。

1.4 Western blot法检测蛋白的表达

收集对照组和处理组细胞,加RIPA裂解液在冰上裂解30 min,12 000 r/min离心30 min,取上清液,采用Lowry法进行蛋白定量。与3×样品缓冲液混合后,煮沸5 min。取50 μg蛋白样品在15%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳约3 h,转印至PVDF膜上2 h。用5%脱脂奶粉封闭1 h后,按预染Marker标记的分子量剪裁转印膜,分别加入Caspase-8抗体(1:300)、C-FLIP_L(1:200)抗体及β-actin抗体(1:1 000),过夜。TTBS洗4次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:800)作用30 min,ECL法显色后GIS凝胶图像分析系统拍照,采用Image J软件分析处理。

1.5 统计学方法

所有数据均为3次独立实验结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS16.0软件进行单因素方差分析和 t 检验,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。细胞生长抑制率根据量效关系的改变,采用周特氏联合指数计算联合指数(CI)^[3]。CI>1提示两药拮抗,CI=1提示两药有相加作用,CI<1提示两药协同。

2 结果

2.1 不同浓度蟾蜍毒素和紫杉醇单药及联合用药对胃癌MGC803细胞的抑制作用

蟾蜍毒素和紫杉醇单用或联用均对MGC803生长有抑制作用,两者单用或联用的抑制作用随着药物浓度和作用时间增加而增强,呈时间-剂量依赖方式,不同浓度、不同时间点之间抑制率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1;联合用药时IC₅₀均较单药低,CI<1,提示两药有协同作用,见表2。

2.2 蟾蜍毒素和紫杉醇单药及联合用药对细胞周期阻滞及凋亡作用

蟾蜍毒素(40 nmol/L)和紫杉醇(25 ng/ml)单药及联合作用细胞24 h,可见周期阻滞及细胞凋亡,联合组凋亡率与单药组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

2.3 蟾蜍毒素和奥沙利铂单药及联合对C-FLIP_L、Caspase-8蛋白的影响

40 nmol/L蟾蜍毒素、25 ng/ml紫杉醇单药及联合作用于MGC803细胞24 h后,Western blot结果显示C-FLIP_L蛋白表达依次下降至对照组的78.38%、64.71%、46.73%,Caspase-8蛋白表达上调至对照组的150.25%、156.86%、180.58%,联合组与单药组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见图1。

表 1 药物对 MGC803 细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The inhibitory effect of agents on MGC803($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	Inhibition rates(%)		
	24 h	48 h	72 h
Controls	—	—	—
PTX (ng/ml)			
12	21.22 ± 3.82 ^a	26.38 ± 2.72 ^a	35.54 ± 5.49 ^a
25	34.19 ± 4.07 ^a	39.47 ± 10.64 ^a	51.87 ± 1.08 ^a
50	46.75 ± 8.39 ^a	50.05 ± 5.17 ^a	63.71 ± 5.23 ^a
100	55.16 ± 1.83 ^a	62.11 ± 6.11 ^a	72.65 ± 9.38 ^a
200	60.83 ± 3.45 ^a	68.09 ± 4.25 ^a	81.77 ± 2.26 ^a
Bufalin (nmol/L)			
10	29.42 ± 3.52 ^a	30.11 ± 1.84 ^a	43.24 ± 2.78 ^a
20	35.07 ± 1.95 ^a	35.14 ± 1.45 ^a	55.06 ± 2.42 ^a
40	40.74 ± 4.40 ^a	45.53 ± 2.52 ^a	59.48 ± 3.23 ^a
80	45.04 ± 2.45 ^a	57.34 ± 8.13 ^a	73.33 ± 2.24 ^a
160	55.74 ± 4.79 ^a	68.86 ± 3.48 ^a	84.31 ± 1.25 ^a
Combination			
10/12	35.63 ± 4.67 ^{ab}	40.23 ± 1.84 ^{ab}	59.05 ± 8.47 ^{ab}
20/25	48.52 ± 1.14 ^{ab}	56.74 ± 7.12 ^{ab}	73.88 ± 1.62 ^{ab}
40/50	57.21 ± 2.76 ^{ab}	63.29 ± 3.95 ^{ab}	82.11 ± 2.08 ^{ab}
80/100	63.56 ± 5.38 ^{ab}	74.90 ± 2.13 ^{ab}	89.60 ± 0.94 ^{ab}
160/200	69.87 ± 3.65 ^{ab}	85.39 ± 2.79 ^{ab}	92.47 ± 1.55 ^{ab}

Note: ^a: $P < 0.05$, compared with the control group; ^b: $P < 0.05$, compared with the single-drug group

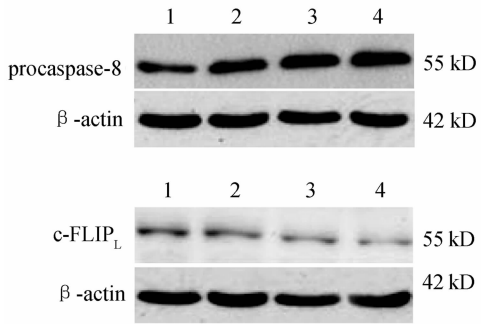
表 2 各组 IC₅₀ 及联合指数 CI
Table 2 50% inhibitory concentrations and combination indexes of different groups

Groups	IC ₅₀		
	24 h	48 h	72 h
Bufalin(nmol/L)	105.25	47.92	16.52
PTX(ng/ml)	78.94	52.78	24.79
Bufalin + PTX	26.46/32.67	16.53/20.20	5.69/6.90
CI	0.77	0.86	0.72

表 3 药物作用细胞 24 h 细胞周期分布 (%)
Table 3 Cell cycle distribution of MGC803 in different groups (%)

Groups	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	3.23	58.34	9.85	24.76
Bufalin	14.13 ^c	42.19	13.50	26.49
PTX	19.74 ^c	11.63	9.94	56.81 ^c
Combined	53.30 ^d	11.76	6.68	26.18

Note: ^c: $P < 0.05$, compared with the control group; ^d: $P < 0.05$, compared with the control group and the single drug groups



1: control group 2: 40 nmol/L bufalin group;
3: 25 ng/ml PTX group; 4: the combined group

图 1 Western blot 检测 Caspase-8、C-FLIP_L 蛋白的表达
Figure 1 The expressions of Caspase-8 and C-FLIP_L proteins detected by Western blot

3 讨论

紫杉醇是从红豆杉中提取的一种活性成分,通过促进微管聚合,抑制微管网重组,导致微管束的排列异常,使纺锤体失去正常功能发挥抗肿瘤活性^[4]。目前,紫杉醇已成功用于治疗卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等,近来研究发现紫杉醇作用胃癌也有较好的疗效^[5]。紫杉醇临床效果显著,但存在一些不良反应,如过敏反应、骨髓抑制、神经毒性、心脏毒性等^[6]。蟾蜍毒素是中药蟾酥中提取的一种毒性配基,属强心甙类物质,具有强心、麻醉、抗炎等作用。研究发现,蟾蜍毒素有诱导白血病细胞及实体肿瘤细胞分化和凋亡等作用。许多研究证实紫杉醇能协同其他药物协同作用胃癌细胞^[6-7],但关于联合蟾蜍毒素对胃癌细胞诱导凋亡的研究尚未见报道。

本研究显示蟾蜍毒素和紫杉醇单药均可抑制胃癌 MGC803 细胞生长,呈时间-剂量累积效应,联合组抑制作用强于单药组,联合指数均小于 1,显示两药有协同作用。我们采用小剂量蟾蜍毒素与紫杉醇分别及联合作用细胞,流式细胞术发现单药均可诱导细胞凋亡,而联合用药组细胞凋亡率高于单药组,差异有统计学意义。同时发现紫杉醇可使细胞阻滞于 G₂/M 期,有学者认为这种阻滞可激活细胞凋亡因子,使细胞最终走向凋亡,为凋亡的前提^[8]。Donaldson 等^[9]研究应用紫杉醇诱导细胞凋亡,发现用药后细胞分裂迅速停滞,20 h 之后启动 DNA 片段凋亡。蟾蜍毒素作为细胞分化、凋亡诱导剂,体外实验及临床已证实,蟾蜍毒素可增强全反式维甲酸诱导白血病细胞分化,缩短达到完全缓解的时间^[10],推测蟾蜍毒素可能是通过缩短紫杉醇启动细胞 DNA 片段凋亡时间,从而增加细胞凋亡率。

Caspase 家族在执行细胞凋亡过程中发挥关键

作用,它的激活或超常表达均可引起细胞凋亡。Caspase-8 属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶,是 Caspase 家族中关键的一员,它的活化是启动 Caspase 级联反应的第一步。Caspase-8 基因与 C-FLIP 基因及 Caspase-10 基因共同位于染色体 2q33-34,C-FLIP 结构上类似 Caspase-8,但不具备 Caspase-8 酶活性,因其具有两个连续的 N 端死亡效应域(DED),可竞争性地与 Caspase-8 上的 DED 结合,阻断死亡信号复合物(DISC)的形成,使肿瘤细胞逃脱由 DISC 发起的凋亡,被称为是针对死亡受体诱导凋亡的负性调节因子^[11]。C-FLIP 作为 Caspase-8 的抑制物,可阻断 Fas、TNFR1、TRAIL-R、DR3 等介导的细胞凋亡^[12]。既往研究已证实 C-FLIP 在胃癌细胞中上调表达,C-FLIP 的表达水平作为病程进展指标之一,并可作为一种新的肿瘤预后因素^[13]。

C-FLIP 在 mRNA 水平上有多种形式,在体内仅有两种蛋白表达:C-FLIP_S(26 kD)和 C-FLIP_L(55 kD),本研究采用长链 FLIP 检测 C-FLIP 的表达,发现对照组、单药组、联合组作用细胞 24 h 后,C-FLIP_L 蛋白表达依次下降,Caspase-8 蛋白表达上调,推定药物通过下调 C-FLIP 的表达,解除了对 Caspase-8 的竞争,使 Caspase-8 蛋白上调,凋亡率随之增加,与 Yang 等^[14]的报道相似。

上述研究为临床联合用药提供一些实验依据,但两药加药顺序、具体剂量、时间和凋亡相关通路仍需进一步研究,其药物疗效有待临床验证。

参考文献:

- [1] Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 472: 467-477.
- [2] Li D, Qu X, Hou K, et al. PI3K/Akt is involved in bufalin-induced apoptosis in gastric cancer cells. [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(1): 59-64.
- [3] Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, et al. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and Cispla-

tin against human teratocarcinoma cell growth; a rational approach to clinical protocol design[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1517-1524.

- [4] Tuan TF, Tsai ML, Yeh KC, et al. Intravenous paclitaxel against metastasis of human gastric tumors of diffuse type[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(4): 773-783.
- [5] Ajani JA, Winter K, Okawara GS, et al. Phase II trial of preoperative chemoradiation in patients with localized gastric adenocarcinoma(RTOG 9904): quality of combined modality therapy and pathologic response[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(24): 3953-3958.
- [6] Gu J, Yamamoto H, Lu X, et al. Low-dose oxaliplatin enhances the antitumor efficacy of paclitaxel in human gastric cancer cell lines[J]. *Digestion*, 2006, 74(1): 19-27.
- [7] Toiyama Y, Tanaka K, Konishi N, et al. Administration sequence-dependent antitumor effects of paclitaxel and 5-fluorouracil in the human gastric cancer cell line MKN45[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57(3): 368-375.
- [8] Guinan P, Shaw M, Mirochink Y, et al. Paclitaxel is more effective than thalidomide in inhibiting LNCap tumor growth in a prostate cancer model[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1998, 20(9): 739-742.
- [9] Donaldson KL, Goolsby G, Kiener PA, et al. Activation of p34 cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis[J]. *Cell Growth Differ*, 1994, 5(10): 1041-1050.
- [10] 朱志图, 金波, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵增强全反式维甲酸对急性早幼粒细胞白血病原代培养细胞的诱导分化[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(4): 314-317.
- [11] Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP[J]. *Crit Rev Immunol*, 2005, 25(1): 31-58.
- [12] Lee SH, Kim HS, Kim SY, et al. Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer[J]. *APMIS*, 2003, 111(2): 309-314.
- [13] Ryang DY, Joo YE, Chung KM, et al. Expression of c-FLIP in gastric cancer and its relation to tumor cell proliferation and apoptosis[J]. *Korean J Intern Med*, 2007, 22(4): 263-269.
- [14] Yang D, Yaguchi T, Yamamoto H, et al. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(10): 1665-1675.

[编辑校对: 周永红]